

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: B200225004

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

蕨类植物超富集稀土元素的机制初探

Preliminary Studies of Hyperaccumulation Mechanism of
Ferns to Rare Earth Elements

赖 莺

指导教师姓名: 王秋泉、黄本立 教授

专 业 名 称: 分 析 化 学

论文提交日期: 2005 年 12 月

论文答辩日期: 2005 年 12 月

学位授予日期: 2005 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2005 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘要（中文）	1
摘要（英文）	2
第一章 前言	1
1.1 稀土元素的来源及危害	1
1.1.1 人体的稀土来源	1
1.1.2 稀土污染对健康的影响	3
1.2 植物修复的研究进展	4
1.2.1 植物修复的概念	4
1.2.2 已发现的重金属超富集植物	5
1.2.3 重金属超富集体的生理机制	6
1.2.4 植物修复的尝试	9
1.3 稀土超富集植物的研究进展	10
1.4 选题依据和本工作主要内容	12
参考文献	13
第二章 稀土超富集体的筛选及稀土元素在土壤—植物体系中分异与富集规律研究	19
2.1 引言	19
2.2 实验部分	20
2.2.1 仪器	20
2.2.2 试剂	21
2.2.3 实验方法	22
2.2.3.1 植物及土壤样品的采集	22
2.2.3.2 植物的培养	26
2.2.3.3 样品中稀土元素含量的测定	27
2.2.3.4 植物水溶性蛋白的提取及分析	27

2.3 结果与讨论	27
2.3.1 标准灌木枝叶中稀土元素含量的测定结果	27
2.3.2 蕨类植物叶及土壤中稀土元素的总量	28
2.3.3 蕨类植物叶及土壤中稀土元素的分布模式	30
2.3.4 稀土元素在土壤—植物体系运输过程中的分异与富集	33
2.3.5 蕨类植物叶绿素中的稀土元素	37
2.3.6 蕨类植物对轻稀土 La 的吸收和富集行为	39
2.3.7 蕨类植物中的稀土结合蛋白	41
2.4 结论	48
参考文献	48
第三章 稀土超富集植物叶中稀土元素的亚细胞分布及赋存状态.....	51
3.1 引言	51
3.2 实验部分	51
3.2.1 仪器	51
3.2.2 试剂	52
3.2.3 实验方法	55
3.2.3.1 细胞分级法 I 流程图.....	55
3.2.3.2 细胞分级法 II 流程图	56
3.2.3.3 细胞分级法 III 流程图	57
3.2.3.4 叶绿体分级流程图	58
3.2.3.5 蛋白含量的测定	59
3.3 结果与讨论	59
3.3.1 三种细胞分级法对稀土元素在单叶新月蕨细胞各部分含量所占比例 的结果比较.....	59
3.3.2 稀土元素在超富集植物叶片中赋存状态的初步研究	64
3.3.3 单叶新月蕨叶绿体各亚细胞器中稀土元素的含量	65
3.4 结论	67
3.5 参考文献	68

第四章 单叶新月蕨叶中稀土结合蛋白的研究	71
4.1 引言	71
4.2 实验部分	71
4.2.1 试剂	71
4.2.2 仪器及主要工作条件	73
4.2.3 色谱工作条件	76
4.2.4 实验方法	77
4.3 结果与讨论	79
4.3.1 单叶新月蕨蛋白中的稀土含量及分布模式	79
4.3.2 单叶新月蕨蛋白的 SE-HPLC/UV/ICP-MS 色谱图	81
4.3.3 单叶新月蕨稀土结合多肽的 RP-HPLC-ESI-MS 与 CE-ESI-MS 谱图	82
4.3.4 单叶新月蕨稀土结合蛋白的 MALDI-MS 和 ESI-MS 谱图	84
4.3.5 单叶新月蕨稀土结合蛋白的等电聚焦谱图	86
4.3.6 单叶新月蕨稀土结合多肽的氨基酸分析结果	86
4.3.7 单叶新月蕨稀土结合多肽的荧光发射光谱	88
4.3.8 单叶新月蕨稀土结合多肽的红外光谱	89
4.4 结论	89
参考文献	90
第五章 乌毛蕨叶中稀土结合物质化学结合状态的探讨	91
5.1 引言	91
5.2 实验部分	91
5.2.1 试剂	91
5.2.2 仪器及主要工作条件	92
5.2.3 色谱工作条件	95
5.2.4 实验方法	95
5.3 结果与讨论	96
5.3.1 乌毛蕨蛋白的稀土含量及分布模式	96

5.3.2 乌毛蕨蛋白的 SE-HPLC/UV/ICP-MS 色谱图.....	98
5.3.3 乌毛蕨稀土结合组分 I 的 ESI-MS 谱图.....	99
5.3.4 乌毛蕨稀土结合组分 II 的 CE-ESI-MS 及 RP-HPLC-ESI-MS 谱图	100
5.3.5 乌毛蕨稀土结合组分 II 的 ESI-MS/MS 谱图	102
5.3.6 乌毛蕨稀土结合组分 II 的 PITC 柱前衍生反相色谱图.....	105
5.3.7 乌毛蕨稀土结合组分 II 的红外谱图	105
5.4 结论	107
参考文献	107
第六章 论文总结与展望	108
6.1 总结	108
6.2 展望	108
已发表和待发表的论文	110
致 谢	112

CONTENTS

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	2
Chapter 1. Preface.....	1
1.1 The source and harmful effects of Rare earth elements.....	1
1.1.1 The source of Rare earth elements (REEs) in human.....	1
1.1.2 The harmful effects of REEs pollution on health.....	3
1.2 Progress in phytoremediation	4
1.2.1 The conception of phytoremediation.....	4
1.2.2 The discovered hyperaccumulator up to date	5
1.2.3 Studies on hyperaccumulation mechanism	6
1.2.4 Phytoremediation attempts	9
1.3 Progress in the study of REE hyperaccumulator.....	10
1.4 Objective, significance and main contents of the dissertation	12
Reference	13
Chapter 2. The screen of REE hyperaccumulator and the study of fractionation and accumulation of REEs in soil-fern system during migration processes.....	19
2.1 Introduction.....	19
2.2 Experimental	20
2.2.1 Apparatus.....	20
2.2.2 Reagents	21
2.2.3 Methods	22
2.2.3.1 Collection of fern and soil samples	22
2.2.3.2 Cultivation of ferns.....	26
2.2.3.3 Determination of REEs contents in samples	27
2.2.3.4 Extraction and analysis of water-soluble proteins in ferns.....	27
2.3 Results and discussion	27
2.3.1 REEs contents in standard bush leaves and twigs.....	27

2.3.2 REEs contents in the lamina and host soil of fern species	28
2.3.3 REEs distribution patterns of the lamina and host soil of fern species ..30	
2.3.4 The fractionation and accumulation of REEs in soil-fern system during migration processes.....	33
2.3.5 REEs in fern pigments.....	37
2.3.6 The absorption and accumulation of La by ferns	39
2.3.7 REEs binding proteins in fern species.....	41
2.4 Conclusions.....	48
Reference	48
Chapter 3. Subcellular distribution and existing species of REEs in REE hyperaccumulators	51
3.1 Introduction.....	51
3.2 Experimental	51
3.2.1 Apparatus	51
3.2.2 Reagents	52
3.2.3 Methods	55
3.2.3.1 Lamina tissue fractionation scheme I.....	55
3.2.3.2 Lamina tissue fractionation scheme II	56
3.2.3.3 Lamina tissue fractionation scheme III	57
3.2.3.4 Scheme of chloroplast components isolation	58
3.2.3.5 Determination of protein concentration.....	59
3.3 Results and discussion	59
3.3.1 Comparison of three cell fractionation methods and determination of REEs contents in different subcellular fractions of <i>Pronephrium simplex</i> lamina	59
3.3.2 Preliminary study on the existing species of REEs in the laminas of two hyperaccumulators	64
3.3.3 REEs contents in subcellular components of <i>P. simplex</i> chloroplast	65
3.4 Conclusions.....	67
Reference	68
Chapter 4. REE binding peptides in <i>P. simplex</i>.....	71

4.1 Introduction.....	71
4.2 Experimental.....	71
4.2.1 Reagents	71
4.2.2 Apparatus.....	73
4.2.3 Working conditions of chromatography	76
4.2.4 Methods	77
4.3 Results and discussion	79
4.3.1 REEs content and distribution pattern of <i>P. simplex</i> protein.....	79
4.3.2 SE-HPLC/UV/ICP-MS spectrum of <i>P. simplex</i> protein.....	81
4.3.3 RP-HPLC-ESI-MS and CE-ESI-MS spectra of REE binding peptide from <i>P. simplex</i>	82
4.3.4 MALDI-MS and ESI-MS spectra of REE binding peptide from <i>P.</i> <i>simplex</i>	84
4.3.5 IEF photograph of REE binding peptide from <i>P. simplex</i>	86
4.3.6 Amino acid composition of REE binding peptide from <i>P. simplex</i>	86
4.3.7 Fluorescence emission spectrum of REE binding peptide from <i>P. simplex</i>	88
4.3.8 IR spectrum of REE binding peptide from <i>P. simplex</i>	89
4.4 Conclusions.....	89
Reference	90
Chapter 5. REE binding substances in <i>Blechnum orientale</i>	91
5.1 Introduction.....	91
5.2 Experimental.....	91
5.2.1 Reagents	91
5.2.2 Apparatus.....	92
5.2.3 Working conditions of chromatography	95
5.2.4 Methods	95
5.3 Results and discussions.....	96
5.3.1 REEs content and distribution pattern of <i>B. orientale</i> protein	96
5.3.2 SE-HPLC/UV/ICP-MS spectrum of <i>B. orientale</i> protein	98
5.3.3 ESI-MS spectrum of REE binding component I from <i>B. orientale</i>	99
5.3.4 CE-ESI-MS and RP-HPLC-ESI-MS spectra of REE binding component	

II from <i>B. orientale</i>	100
5.3.5 ESI-MS/MS spectra of REE binding component II from <i>B. orientale</i> .	102
5.3.6 PITC precolumn derivation reverse phase chromatograph of REE binding component II from <i>B. orientale</i>	105
5.3.7 IR spectrum of REE binding component II from <i>B. orientale</i>	105
5.4 Conclusions	107
Reference	107
Chapter 6. Conclusion and prospect	108
6.1 Conclusions of this study	108
6.2 Prospect.....	108
Publications during Author's PhD study	110
Acknowledgements	112

摘 要

我国稀土元素在农业中的广泛应用而造成潜在的环境风险已日益引起关注。近年来出现的植物修复技术提供了一种价廉且有效的土壤污染治理的途径,其实现的前提是找到稀土元素的超富集植物。然而与其他重金属元素相比,稀土元素不论在其超富集植物的数量还是超富集机理的研究深度上都还远远不够,而且研究结果常常不能相互验证。

本论文以蕨类植物为研究对象,研究蕨类植物与土壤构成的体系中,稀土元素在转运过程中发生分异和富集的规律;筛选稀土元素超富集植物,在细胞及分子水平上研究稀土元素在超富集植物体内的分布及赋存状态,并进一步分离表征在超富集中起重要作用的稀土结合蛋白,探讨可能的超富集机制,为将来稀土污染的植物修复提供理论依据。

在福建南靖乐土亚热带雨林自然保护区,我们发现了一种新的稀土元素超富集植物——单叶新月蕨 (*Pronephrium simplex*),其叶中稀土含量高达 1.2 mg g^{-1} 。进一步研究表明单叶新月蕨叶中的稀土元素主要与细胞壁和蛋白质组分相结合,并且蛋白中稀土元素总浓度 ($2899.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) 远高于细胞壁;对其叶绿体分级的结果表明,稀土元素基本平均地分布于叶绿体被膜和类囊体,而类囊体中绝大部分的稀土元素与光系统 II 结合;运用凝胶高效液相色谱(SE-HPLC)与 ICP-MS 联用技术在其叶中发现一种稀土结合多肽,稀土含量高达 $3000 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$,且优先结合轻稀土;进一步的表征显示该多肽的分子量为 5073Da,具有 β 折叠结构,等电点约为 3.7,含有较多的脯氨酸和甘氨酸,中等含量的谷氨酸和天冬氨酸,在生理条件下能给稀土元素提供可能的结合位点,因此该多肽很可能在稀土超富集方面起重要作用。除此之外,我们对已知的稀土超富集植物——乌毛蕨也进行了研究,发现其叶中也有类似的稀土分布情况,但它的细胞壁富集稀土能力高于单叶新月蕨。我们发现乌毛蕨叶中含有两种稀土结合物质,均主要与轻稀土相结合;其中一种是分子量为 9016.6 Da 的多肽;另一种的稀土含量较高,电喷雾质谱的结果显示其分子量仅为 99 Da,且有较强的酸性,红外光谱表明其含有酰胺基团。

关键词: 稀土元素; 超富集植物; 蛋白

Abstract

Rare earth elements (REEs) have been widely used in agricultural activities in China for more than 30 years, the resulted environmental risk has attracted gradually increasing attention. Phytoremediation, a technique using plant hyperaccumulator to remove contamination from soil and water, becomes more important as it is environmental friendly and cost-effective. Although many researches have been carried out on the phytoremediation of toxic heavy metals, the researches on REEs, especially in hyperaccumulation mechanism at molecular level, are just on the way to answer “why” and “how to do”.

In this dissertation, the fractionation of REEs during uptake and migration processes in different fern species, which were sampled from Nanjing natural reservation of semitropical rain-forest located in Fujian, southeastern part of China, were investigated. Among 11 fern species sampled, a species, *Pronephrium simplex*, was discovered and recognized as a new REE-hyperaccumulator that accumulates REEs in its lamina as high as 1.2 mg g^{-1} , 35 times higher than that in its host soil. Moreover, the subcellular distribution and possible existing chemical forms of REEs in its lamina were studied, and one REE binding peptide which might play a key role in REE hyperaccumulation was separated and characterized. Results showed that in the lamina of *P. simplex*, most REEs are bound with cell wall and proteins, and ΣREEs concentration in proteins, $2899.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, is much higher than those in cell wall; in the chloroplast of *P. simplex*, REEs distributed almost equally in chloroplast membrane and thylakoid, while most REEs in thylakoid are binding with photosystem II (PS II); a new REE-binding peptide, which can accumulate ΣREEs up to $3000 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ and has high affinity for light REEs, was discovered in the lamina of *P. simplex*; further characterization of the peptide showed its molecular mass is 5068.4 Da, and may have β -sheet structure; isoelectrofocusing electrophoretic photograph indicated that it is acidic peptide with the IP of 3.7; amino acid composition indicated that the peptide has relatively higher content of proline and glycine, moderate glutamic acid/glutamine (Glx) and aspartic acid/asparagine (Asx), which can provide possible binding sites for REEs under physiological conditions.

In addition, *Blechnum orientale*, a well-known REE-hyperaccumulator, was also investigated on its possible accumulation mechanism. Results showed that REEs distribution in its lamina is basically similar with that of *P. simplex*, except that its cell wall can accumulate relatively higher content of REEs. There might be mainly two REE binding components found in the lamina of *B. orientale*, and both of them prefer to bind with light REEs; one is a peptide of 9016 Da molecular mass; the other one containing higher REEs content an acidic compound of only 99 Da, IR spectrum showed that it contained carboxamide group.

Such information should be useful for understanding of both the storage and physiological role of REEs in the hyperaccumulators and further studies on the phytoremediation of REEs' contamination.

Keywords: Rare earth elements (REEs); Fern; protein

第一章 前言

1.1 稀土元素的来源及危害

根据国际纯粹与应用化学联合会对稀土元素的定义，稀土元素是门捷列夫元素周期表第三副族中原子序数从 57 至 71 的 15 个镧系元素，即镧 La、铈 Ce、镨 Pr、钕 Nd、钷 Pm、钐 Sm、铕 Eu、钆 Gd、铽 Tb、镝 Dy、钬 Ho、铒 Er、铥 Tm、镱 Yb、镥 Lu，再加上与其电子结构和化学性质相近的钪 Sc 和钇 Y 共 17 个元素^[1]。由于稀土元素具有相同的外层价电子，它们的物理化学性质非常相近。

根据 Y 和镧系元素的化学性质、物理性质和地球化学性质的相似性和差异性，以及分离、提取的需要，常把他们分为轻稀土元素和重稀土元素两组，以钆为界 La 至 Eu 为轻稀土，钆以后为重稀土元素，这种分组在研究稀土元素在环境中分布时也有实际意义。

1.1.1 人体的稀土来源

稀土元素在我国储量巨大，广泛应用于工业、农业、林业和畜牧业等领域。尤其是稀土农用卓有成效。大量研究证明^[2]，适量稀土对植物确有促进生根发芽、增加叶绿素含量、增强光合作用强度、改善作物对大量营养元素的吸收等作用，从而促进作物干物质的积累，使其产量和质量得到提高。70年代以来，我国农用稀土量日增，至2001年累计稀土农用面积已达到6.5亿亩，应用地区涉及全国21个省、市、自治区^[3]。

自然界中的稀土元素通过土壤、空气和水进入植物体和动物体，进而通过食物链进入人体。然而直到目前为止，稀土元素是否对人体必需元素仍不清楚，因此稀土摄入的安全性问题成为人们日益关心的热点。外源稀土进入土壤后通过沉淀、络合、吸附、氧化还原等反应与土壤中的不同组分结合，以不同的形态存在。但是由于外源稀土与土壤的反应时间较短，必定会有一部分稀土元素存在于土壤溶液中或是与土壤颗粒物以比较弱的方式结合，它们很容易为植物的根所利用。大量实验表明^[4-6]稀土元素可在农作物的各个部位富集。尤其令人关注的是施用稀土微肥后，蔬菜的可食用部分稀土含量明显

增加^[7]，稀土元素完全可以通过食物链进入动物及人体。

1993年，苏德昭^[8]对全国17个省市主要食品中的稀土总量作了调研，得到我国居民膳食稀土摄入量为2.10~2.50 mg d⁻¹（表1-1）。

表1-1 中国居民膳食稀土摄入量（以氧化物计）^[8]

Table 1-1 Dietary intake of rare earth elements by Chinese residents (REEyOx)

食品类	稀土含量 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	稀土食用量 (g)	稀土摄入量 (mg d ⁻¹)
粮食类	2.0	470~500	0.94~1.00
薯类	2.0	80~100	0.16~0.20
蔬菜类	1.0	400~450	0.40~0.45
水果类	1.0	30~50	0.03~0.05
豆、豆制品	2.0	30~50	0.06~0.10
肉、蛋、禽类	0.5	100~120	0.05~0.06
鱼、水产品类	1.0	20~25	0.02~0.025
奶、乳制品类	2.0	50~70	0.10~0.14
食糖、糕点类	2.0	30~50	0.06~0.10
饮料（茶、酒、冷饮）	0.5	100~150	0.05~0.075
食用油、调味品、淀粉	1.0	80~100	0.08~0.100
饮用水	0.1	1500~2000	0.15~0.20
			日摄入量2.10~2.50

资料来源：苏德昭等：中国预防医学杂志，1993年。

另据朱为方等^[9]调查，江西赣南重稀土区、轻稀土区和对照区成人膳食稀土摄入量（以氧化物计）分别达6.67、5.98、3.33 mg d⁻¹，稀土区居民摄入量已超过日允许摄入量（4.2 mg）。

1.1.2 稀土污染对健康的影响

虽然在一般情况下或一定时期内接触稀土不会给人体带来明显的危害,但长期低剂量暴露或摄入则可能会给人体健康或体内代谢带来不良的后果。事实上,许多疾病已被初步确认与稀土元素有关^[10,11]。值得注意的是,朱为方等^[12]的研究表明:江西赣南稀土区儿童的智商明显低于非稀土区。体感诱发电位(Somatosensory evoked potential, SEP)和听觉脑干电响应(Auditory brainstem electric response, ABR)的测定^[13]显示,虽然稀土区与非稀土区ABR并无明显差异,但SEP的测定表明稀土区儿童中央神经(median nerve)到丘脑(thalamus)的传导缩短,特别是到一级原初体感响应区(first grade primary somatosensory responsive region, S1)的传导减少。这些事实说明尽管稀土在脑干中难以积累,但它对大脑皮层非常敏感,能够导致亚临床损伤。这可能是因为稀土离子对T2型电压门控Ca²⁺通道具有拮抗作用,这种作用是电压非依赖性的,存在剂量效应关系,因而长期低浓度摄入稀土可能是有害的。冯嘉等^[14]调查了生活在江西赣南轻稀土高背景区和对照区未从事过稀土采选作业和无任何病史的当地20~50岁表观健康农民,发现轻稀土区男性人群血清中胆固醇(CHO)、甘油三脂(STG)、免疫抗原(IgA)含量与对照区男性有极显著性差异,而轻稀土区女性人群血清总蛋白(TSP)、白蛋白(AL)、谷丙转氨酶(GPT)含量与对照区女性亦有极显著性差异,可见稀土的长期摄取必定加重人体肝、肾负担,并对人体的某些免疫功能产生一定的负面影响。

一定剂量的稀土元素还可能具有“三致”(致癌、致畸、致突)作用。黄丽玫^[15]等用VMT检测了14种稀土元素的致突变性,结果表明:重稀土最强,中稀土次之,轻稀土最弱,阈值为1~5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。另据报道^[16]:一定浓度的稀土元素能够导致小鼠骨髓细胞染色体畸变,且能对鸡胚产生影响,可使鸡胚发生畸变。杨维东等^[17]研究发现,当Ce(NO₃)₃浓度为1 mmol L⁻¹时,3T3细胞DNA没有明显的损伤,但是当Ce(NO₃)₃浓度升至5 mmol L⁻¹时,对3T3细胞DNA表现出明显的损伤作用,提示Ce(NO₃)₃尚具有一定的遗传毒性,但这种毒性比较弱。由于稀土元素极难进入正常细胞,因此推测稀土元素对遗传物质DNA的损伤极有可能与重金属元素一样,是通过脂质过氧化作用造成的。

动物实验亦已证明高浓度的稀土具有重金属离子的特性,并显示出较大的毒性。稀土的中毒症状主要是:痛苦扭动、供给失调、呼吸困难、抑郁、脚趾背面轻度拱起

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库